

Electrophorèse

I-Définition :

C'est une technique d'analyse permettant de séparer les molécules électriquement chargées par migration dans un champ électrique.

Elle est essentiellement utilisée en biochimie clinique pour différencier les fractions protéiques d'un liquide biologique, ces applications sont de plus en plus nombreuses.

II-Principe :

Le principe de l'électrophorèse est la migration de molécules chargées dans un champ de molécules électrique continu, plus la charge est élevée, plus la vitesse de migration est grande.

La technique de l'électrophorèse permet par la migration différentielle, la séparation des molécules en fonction de leur charge.

La charge des molécules organique est apportée par les fonctions ionisables essentiellement des groupements acide carboxylique, amine, et plus difficilement le groupement phénol de la tyrosine, thiol de la cystéine et l'indazole de l'histidine.

Les protéines sont les principales molécules organiques d'intérêt biologique susceptibles de procéder une charge électrique.

En biochimie clinique l'électrophorèse est une méthode d'exploration de différentes méthodes des protéines dans les liquides biologiques, sérum, urine, LCR

➔ Différentes fonctions interviennent sur la migration électrophorétique.

a-La nature de la protéine

Le champ électrique

La solution tampon

La nature du support.

a-La nature de la protéine

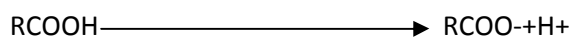
La charge globale d'une protéine est due à la différence entre le nombre de fonctions ionisées cationique et anionique

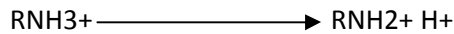
Elle dépend de deux fonctions :

De la composition en acide aminique c'est-à-dire de la nature même des protéines

b-l'influence de la charge en fonction du pH

L'état d'ionisation des acides carboxyliques et aminés varie suivant les échanges suivants :





Dont les pK sont en fonction du pH

Pour un acide aminé simple :

- ➔ A pH très acide les fonctions COOH ne sont pas dissociées alors que les fonctions NH_3 sont ionisées La charge globale +
- ➔ Lorsque le pH augmente (alcalin) les fonctions carboxyliques libèrent leurs protons et deviennent ionisées, les fonctions aminées les libèrent aussi, mais perdent leurs charges.
- ➔ A pH augmenté les fonctions carboxyliques et les fonctions amines non dissociées la charge globale est négative.

L'acide aminé migre vers l'anode

Il existe un pH appelé pH isoionique pour lequel l'acide A- a une charge globale nulle, ce point est caractéristique de l'acide A- qui à ce pH ne migre pas en électrophorèse, les chaînes peptidiques et les protéines ont une charge qui évolue en fonction du pH en raison des acides A- portant +++ fonctions ionisable sur leurs chaînes

A pH très acide elles sont chargées positivement et migrent en électrophorèse vers la cathode

A pH très basique elles sont chargées négativement et migrent vers l'anode

Comme pour les acides aminés on peut définir un pH appelé point isoionique pour lequel la charge globale diminue due à la fonction ionisable nulle, ce point est caractéristique des protéines.

Influence de la composition ionique :

Au pH précédemment défini (isoionique) les protéines paradoxalement peuvent migrer en électrophorèse.

En effet le pH est une notion théorique qui suppose que l'on considère une solution pure des protéines.

Or en pratique les protéines se trouvent dans un tampon dont les ions peuvent amener l'ionisation de certaines fonctions, provoque ainsi une charge plus ou moins grande de la protéine (ionisation de la fonction phénol de la tyrosine et la fonction thiole de la cystéine)

Elles peuvent être ainsi absorbées sur la molécule protéique, ce qui contribue en variation de charge de la molécule, on définit d'un pH isoionique différentes protéines isoioniques pour laquelle la protéine ne migre plus en électrophorèse. Celui-ci n'est pas constant pour une protéine mais varie avec la force ionique du tampon.

La force d'un tampon constituée par des ions monovalents est pratiquement équivalente à la molarité de la solution, ce qui n'est pas le cas d'un tampon possédant les ions bivalents ou trivalents elles ne doivent pas être trop élevées.

c- le champ électrique :

Pour obtenir une migration il est indispensable de transformer le courant alternatif de secteur au courant continu, l'aide de redresseur monté de deux systèmes de control :

1-multiampemetre

2-voltemetre

La vitesse de migration de la molécule augmente proportionnellement au champ électrique.

La différence de potentiel doit être assez élevée de l'ordre 250 300volte.

L'intensité du courant électrique doit être faible afin de limiter le dégagement de chaleur par effet de joule qui est proportionnel au carré de l'intensité, cette chaleur peut en effet entrainer la dénaturation des protéines et évaporation de la solution tampon.

d- le choix du support

Est le matériel dans lequel s'effectue la migration des protéines, il doit être chimiquement inerte afin d'être incapable de réagir avec les protéines.

III-Les techniques de l'électrophorèse :

La technique de migration electrophoretique se décompose en deux types :

La migration des protéines sériques dans le champ électrique

Leurs révélations

a-La réalisation de la migration :

Matériel :

Bande d'acetate de cellulose présente

Une solution de tampon venoral pH>8.6

Support de migration

Une cuve munie d'un portoir :

Cette cuve est séparée en deux par cloison transversale étanche. De chaque coté de celle-ci se trouve le tampon dans le quel est placé a première électrode les bandes electrophoretiques qui seront déposées dans le portoir après avoir été imprégnées de tampons.

- Un applicateur permet de déposer le sérum sur les bandes electrophoretique.
- Un générateur qui fourni un courant continu de faible intensité.
- Celui-ci est relié aux électrodes de la cuve

Préparation de l'échantillon :

Le sérum est utilisé de préférence, le plasma en raison de la présence de ce dernier de fibrinogène qui risque de fausser les analyses.

Ce sérum ne doit pas présenter des traces d'hémolyse, la quantité nécessaire est très faible entre 20 et 30 μ l

Préparation des bandes d'acétate de cellulose :

Les bandes sont mise a trappé 10-20mm dans la solution tampon.

Puis elles sont rapidement arrosées par contact sur le papier joseph et identifiées afin d'éviter les erreurs ultérieures.

Elles sont ensuite déposées sur le portoir de la cuve de tel sorte que l'angle soit coupé en face de soit en bas et à droite.

Elles sont placées les unes a coté des autres bien tendues a l'aides des barrettes de fixation.

La solution tampon est mise à la cuve des deux coté de la cloison transversale.

Le portoir une fois mis en place dans la cuve le passage du courant continu d'une électrode à une autre ne peut se faire que par les bandes electrophoretiques imprégnées de tampons.

Le dépôt des échantillons :

Le dépôt du sérum sur le support est d'une importance capitale, il doit se former un trait fin linéaire perpendiculaire au sens de l'électrophorèse sans toucher les bords de la bande.

Il se réalise à l'aide de l'applicateur.

L'électrophorèse permet donc de connaitre la concentration relative de chaque fraction de protéine sérique.

Pour rétablir la concentration réelle, il faut réaliser sur le même échantillon le dosage des protéines totales.

La migration :

Les électrodes sont branchés sur le générateur l'électrophorèse ayant bien a un $pH > pHi$

Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode.

L'extrémité de la bande sur lequel le dépôt a lieu doit être correspondant a l'électrode (-)

Le générateur est mis en route est réglé a une tension de 250volte

La migration dur 30 à 45 min

b- la révélation :

Une fois la migration electrophoretique réalisée, il n'est pas possible de distinguer directement les différentes fractions protéiques, il est important de les révéler c'est-à-dire de faire apparaitre sur le

support une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la concentration OH à l'activité relative des différentes fractions étudiées.

Les techniques sont nombreuses, les plus utilisées en médecine vétérinaire est de mettre en évidence l'ensemble des protéines.

La révélation des protéines sériques :

Cette technique est basée sur le principe de la colorimétrie, un colorant composé de molécules à nombreuses doubles liaisons (rouge de ponceau, bleu de coomassie, l'amidoschwarz) se fixe spécifiquement sur les protéines.

L'intensité de la coloration est alors proportionnelle à la concentration protéique.

En réalité la spécificité des réactifs n'est pas absente et la fixation de colorant varie en fonction des protéines.

Pratiquement une fois la migration terminée, les bandes sont retirées de la cuve et trempées entièrement pendant 5 min dans une solution de coloration.

Cette manipulation provoque une coloration presque uniforme de la bande.

La fixation du colorant sur les protéines est cependant plus forte que sa fixation sur le support.

L'utilisation ultérieure d'une solution acide acétique diluée permet une coloration du support ainsi une fois sortie de la solution du colorant les bandes électrophorétique sont essorées rapidement avec du papier filtre puis trempées dans deux bains successifs d'acide acétique pendant 5 min

Cette technique à ce stade permet l'obtention de la bande électrophorétique blanche sur laquelle s'observe des taches rouges correspondantes aux différentes fractions protéiques.

La densité de la coloration de chaque tache dépend de la concentration des protéines de chaque fraction.

La quantification de cette coloration et ainsi l'obtention de différents pourcentages des protéines est basée sur le principe de la spectrophotométrie

L'absorption d'un faisceau lumineux monochromatique par chaque bande colorée varie selon l'intensité de la coloration

Afin de réaliser cette mesure les bandes sont préalablement transparentes à l'aide d'une solution contenant du méthanol et de l'acide acétique

Elles sont ensuite placées dans une lame de verre permettant la lecture par un densimètre ou intégrateur et spectrophotomètre adapté à la lecture des bandes électrophorétiques, il est composé d'une source lumineuse d'un monochromateur et d'une cellule photoélectrique

La bande électrophorétique passe progressivement à travers le faisceau lumineux ce qui permet de connaître l'intensité de la coloration de chaque tache donc la répartition des protéines de chaque fraction.

C'est le rapport de la surface de pic sur la surface totale de Graf qui indique le pourcentage des protéines de chaque fraction

Application biologique

Protéine sérique

L'aspect de l'électrophorèse varie suivant les espèces considérées

Ex : chez la bovine albumine alpha beta gamma

Chez les carnivores albumine alpha_{1,2}, beta_{1,2,3}, gamma

Modification pathologique :

a-Hypo albuminémie :

Elle se traduit par une baisse de la hauteur du pic d'albumine et retenti généralement sur le taux des protéines totales elle peut être due :

Défaut d'apport protéine

Excès d'utilisation pour des synthèses massives.

A une fuite protéique dans les urines et les sels ou par des brûlures.

Un défaut de synthèses par le foie (le cas le plus fréquent)

b-Agammaglobulinémie

Il s'agit de l'absence des acides (gamma globuline) elle peut être observée chez le jeune qui n'a pas bénéficié des acides aminés de la mère (le veau qui n'a pas bu le colostrum) ou lors de déficit immunitaire congénital

c-Agammopathie monoclonale :

Elle se traduit par des pics étroits dans le deuxième gamma globuline et traduit (réveil) des sécrétions massives des immunoglobulines par des plasmocytes devenus tumoraux (myélome)

d-l'inflammation :

tout processus inflammatoire entraîne dans un premier temps l'augmentation en pic des alpha globuline qui sont des protéines témoins de l'inflammation, puis la réaction immunitaire de l'organisme conduit à l'augmentation des globulines qui persiste malgré l'arrêt de processus inflammatoire, ce sont le retour des alpha 2 à l'animal qui traduit la fin de l'inflammation

L'existence et l'aspect de l'augmentation des alpha2 gamma permettent donc de dater approximativement le processus et d'apprécier son évolution vers la guérison ou la chronicité.

Affectation hépatique :

L'électrophorèse peut être d'un grand intérêt en mettant en évidence des albumines et surtout d'un bloc beta et gamma

Les deux fractions augmentent et tendent à se qui traduit alors un processus évolutif chronique dit cirrhose.

f-révélation des activités enzymatique

Cette technique de révélation permet la mise en évidence des différents iso enzymes de la LDH et de la créatine kinase ck

Elle permet ainsi de préciser l'origine cardiaque musculaire en outre de l'augmentation du taux sérique de ces enzymes.

g-immunoélectrophorèse

Une fois la migration surgèle terminée les acides antiprotéiques sont déposés dans une gouttière parallèle.

STAFF

Conception : ManOfAction

D'après le cours de : M.Meharzi

Disponible sur : <http://veto-constantine.com>

Diffusé par : Taxi Phone Brahim

Remerciements : Napster94
